HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サハリン油田開発に伴う原油汚染事故を想定したバイオレメディエーション技術の可能性
Author(s)	坂口, 直史; Mohd Taha, Ahmad Iskandar Bin Haji; 牧, 秀明; 濱田, 誠一; 森川, 正章; 奥山, 英登志
Citation	日本生物工学会, 88(4), 150-157
Issue Date	2010-04
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/43822
Type	article (author version)
File Information	seibutsukogaku.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

サハリン油田開発に伴う原油汚染事故を想定したバイオレメディエーション技術の可能性

坂口直史[1,2]・Ahmad Iskandar Bin Haji Mohd Taha[3]・牧 秀明[4]・濱田誠一[5]・森川正章[1,2,3]・奥山英登志[1,2,3]

[1]060-0810 札幌市北区北１０条西８丁目・北海道大学理学部生物科学科

[2]060-0810 札幌市北区北１０条西５丁目・北海道大学大学院地球環境科学研究院・環境生物学部門

[3]060-0810 札幌市北区北１０条西５丁目・北海道大学大学院環境科学院・生物圏科学専攻

[4]305-8506 つくば市小野川１６－２・国立環境研究所・水土壌圏環境研究領域

[5]047-0008 小樽市築港３－１・北海道立地質研究所

概要

2008年ロシア・サハリン島の油田開発は商業段階に入った。北海道沿岸域はサハリン油田開発を原因とする油井の暴噴、パイプラインやタンカーなど船舶の事故による汚染の危険に曝されている。石油により汚染された海域、海岸域の回復にはさまざまな対応が必要である。本総説では、これまで起こった主にタンカーの石油流出事故とそれに対する生物学的処理法（バイオレメディエーション：BR）による対応、特に北海道の冷涼な気候とBRについてその有用性を考慮しながら紹介する。北海道オホーツク海沿岸では既に石油汚染除去を想定したバイオスティムレーション法（BS）が試験的に実施されている。BSは汚染現場に栄養塩などを与え土着の微生物の石油分解能を賦活化する方法である。一方、筆者らはBSと、別に取得した石油分解能力の高い細菌を汚染現場に投与するバイオオーグメンテーション法（BA）の特長を併せ持つ原地性バイオオーグメンテーション法(ABA)の有効性を検討している。サハリン油田が原因で汚染事故が起きた場合のABAの実用の可能性について論じる。

はじめに

サハリン油田はロシア・サハリン島の北東部沖合のオホーツク海にある油田と天然ガス田であり、6 箇所の鉱区（サハリン I から VI）が開発されている。サ

ハリンⅠとⅡを合わせた原油の推定可採埋蔵量は 34 億バレルとされ、現在この２鉱区が本格稼動している。原油の生産は 1999 年から開始され、日本や韓国へ輸送されている。冬期は結氷のため、タンカー輸送が不可能であったが、2008 年 12 月からのサハリンⅡフェーズ２による原油生産活動の本格化とともに、サハリンⅡからサハリン南部アニワ湾の不凍港、プリゴロドノエへのパイプラインが完成し、同港から原油の通年出荷が開始された。これにより、年間約 90 隻のタンカーがアニワ湾を航行することになる（FoE Japan HP; http://www.foejapan.org/en/）。

わが国では、サハリン油田開発に伴う油流出事故が起きた場合の対策が強化されている。例えば、海上保安庁は2000年、津軽海峡及び宗谷海峡における原油輸送タンカー事故を想定して、北海道沿岸海域排出油防除計画を改訂し（海上保安庁HP；http://www.kaiho.mlit.go.jp/syoukai/soshiki/keikyu/kankyou/）、北海道に大型油防除資材を重点的に配備した。北海道は2004年に流出油事故災害対応マニュアルを作成している[1,2]。また、大規模な油汚染事件発生時における日本、中国、韓国、ロシアの協力関係等を定めたNorthwest Pacific Action Plan（北西太平洋地域海行動計画）の油流出緊急時計画も見直され、その地理的対象範囲がサハリン油田の鉱区があるサハリン東部沿岸まで拡大されている(国土交通省HP；http://www.mlit.go.jp/index_e.html)。海上保安庁は北海道沿岸地域を油汚染の影響の大きさ(環境脆弱性指標)によって区分した詳細な環境脆弱性指標図（略称：ESI マップ；図1）を作成しており、これによって重点的に浄化作業を行う地域の把握が可能になった[3]。

サハリン油田開発に伴う油汚染事故が実際に起きた場合の被害額の想定が行われている[4]。1 月に宗谷海峡でタンカーからの漏洩事故が起こり、約 5800 ｋL の原油が流出した場合、網走市の漁業に限定したものではあるが、その予想被害額は最大で 23 億円に上るとされている。後述するナホトカ号からの重油流出事故の際の被害請求総額が 358 億円であったのに対し、補償額は 261 億円であり、漁業被害の請求額 50 億円に対する補償額が 15 億 7 千万円に過ぎなかった（国土交通省 HP；http://www.mlit.go.jp/index_e.html）というのは興味深い事実である。

以上のように法的な整備、国際的協力関係、また国・関係自治体の協力体制も

整い、被害の予想もされてはいるが、石油汚染の生物学的処理法（バイオレメディエーション；BR）の実施についてはほとんど考慮されていない。わずかに国立環境研究所や北海道立地質研究所などの取組みはある（後述）ものの、研究者個人に任されているのが現状である。土壌汚染対策目的であり、海岸漂着油は対象になっていないが、2003年2月に施行された土壌汚染対策法に基づく環境省と経済産業省による「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の策定（2005年）、環境省による「油汚染対策ガイドライン」の発表（2006年）はわが国におけるBR技術の実用に道を拓いたといえよう。

石油で汚染された環境の修復技術には機械力や人力による物理的方法、油吸収剤や油処理剤の散布を行う化学的方法、及び BR がある。労力やコスト、環境に与える影響を最小限に抑えることが可能な点でBR技術が優れていると考えられるが、わが国の実用例は非常に少ない。

BR にはバイオスティミュレーション法（BS）と一般的には汚染箇所と異なる場所で取得された単一の汚染物質分解菌やその混合物からなるコンソーシアを大量培養し汚染現場に直接投入するバイオオーグメンテーション法（BA）がある。BS、BA と、後述する原地性バイオオーグメンテーション法（Autochthonous bioaugmentation; ABA）の違いを模式的に図 2 に示し、それぞれの特徴について図 3 にまとめた。

ABA は BS と BA の長所を生かし、短所を補う汚染除去方法として提案されている [5)]。ABA は汚染箇所、または油井の近接地、港湾、原油貯蔵地、タンカーの航路沿いの海域や海岸など汚染の可能性が高い場所から予め得たサンプル（水、土壌、海砂など）を用いて原油分解能力を有する微生物群を、実際に汚染処理を行なう環境に類似した条件で選択的に集積し、その微生物群または単離株を汚染箇所に還元することで汚染を除去するという、いわば ready-made の BA である。

サハリン油田で油井の暴噴、パイプラインの破損、タンカーなど船舶の事故により多量の原油・石油類が流出した場合、北海道沿岸の汚染は避けられない [6)]。漁業が主産業である北海道において原油汚染が与える影響は大きく、汚染事故が起きた場合はできるだけ迅速、かつ短期間でその影響を抑えるための備えが必要である。本稿では、これまでにわが国を含め世界で起きた海洋・海岸の石油汚染

事故とその対応を概観する。次いで、低温下での BR の実例、サハリン油田を原因とする北海道沿岸における原油汚染を想定した BS の実例と ABA の利用性について解説する。ABA についてはまだ実験室レベルの結果であるが、原油分解菌群の集積を、液体培地で行うのではなく、油汚染が予想される現地の海砂（土壌）と予想される汚染物質である原油を用いて土壌中で集積し、それを汚染された土壌に投与するのが特徴である。また、コンソーシアだけではなく、単離株を使った実験結果についても触れる。

海岸の石油汚染とバイオレメディエーション（BR）

わが国近海で起きた石油流出事故として 1997 年 1 月 2 日のナホトカ号の例がある（海上保安庁海上技術安全局安全基準課安全評価室 2000 年 HP；http://www.mlit.go.jp/kaiji/seasafe/safety11_.html）。ロシア船籍のタンカー「ナホトカ号」が島根県沖 106 km で波浪により船体が破断し、約 6,200 トンの重油が流出した[7)]。1 月 7 日には福井県坂井郡三国町（当時。現・坂井市三国町）の海岸にナホトカ号の船首部分と重油が漂着した。この事故で、島根県から秋田県にかけて広範囲の海岸が汚染された[7)]。

流出した重油の回収は、ほとんどが物理的手法によって行われた。海上での浮流油の回収は主に油回収船などの機械の力を借りて、砂浜などの漂着油は約 30 万人近くと言われるボランティアの人力によって回収された。海上で回収された重油が約 6,400 kL であったのに対し、陸上で回収された重油は約 40,300 kL（海水、土砂などを含む）であった。陸上での回収方法は先に述べたように主に手作業であり、作業に関わったボランティアのうち 5 人が過労死するなどの二次災害も起きている（日本太平洋資料ネットワーク HP；http://www.jprn.org/japanese/library/ronbun/saigai.html）。ナホトカ号の事例を含めて本稿で扱うタンカーからの石油流出事故について表 1 にまとめた。

1989年3月24日、アメリカ船籍のタンカー、エクソン・バルディス号がアラスカで座礁し、約4,0000 トンの原油が流出した（海上技術安全局安全基準課安全評価室 2000年）のは歴史に残る石油流出事故であろう。洋上での回収作業も行われたが、2,400 kmの海岸が汚染された。1989年に最初のBRのフィールド試験が、Knight Islandの二箇所で行われた。この試験は親油性肥料 Inipol22 (CECA S.A.

Paris La Defense, France) と親水性肥料 Customblen28-8-0 (Sierra Chemicals, Milpitas, Calif.) を添加したBSであり、その有効性が確認されている。上記の2種類の肥料を用いたBSは1990年と1991年の夏期に、それぞれ1426件、223件行われている[8,9]。

タンカーからの石油流出による海岸汚染は多数の事例が知られているが、イスラエルでの原油流出事故（1991年8月）[10]や北スペインでの重油流出事故（2002年11月）[11]の際もBS試験が行われ、施肥による効果的な油分解が報告されている。一方、1994年夏にVenosaら[12]は、アメリカ デラウェア州の海岸で原油を意図的にまき、BSのフィールド試験を行い、その有効性を報告している。

以上紹介した事例は油種を問わず、石油の汚染除去に BS が有効であることを示している。これらの事実は、ほとんどの海岸域には石油分解菌が常在しており、施肥によってその賦活化が可能であること、また、これらの石油分解菌を有効に利用することが、より優れた浄化効果をもたらす可能性を示唆しているといってよいであろう。

北海道沿岸地域でのバイオレメディエーション（BR）適用の可能性

低温環境下のBRとその有効性　気温は、流出油の性状、細菌の個体数、油分解活性などに大きく影響する。低温環境下では、原油の粘度が上がり、一方でより毒性の高い低分子量の炭化水素の揮発量が小さくなり、生物分解の速度を低下させる[13]。

一般的に土壌中では30℃から40℃の範囲、淡水中では20から30℃の範囲、海水中では15から20℃の時にもっとも分解率が高い。北海道網走の8月と2月の平均気温は、それぞれ19.1℃、-7.2 ℃である（日本気象協会HP；http://www.jwa.or.jp/）ことから、北海道沿岸でBRを実施するに当たって克服しなければならない課題の1つが低温である。

Mulkins–Phillips と Stewart[14] は、海砂と海水をサンプルとして、石油分解菌を液体培養により集積した。この集積物で液体培地中の燃油（Bunker C fuel oil）の分解率を調べた。15℃では 7 日間の培養で可溶性芳香族化合物の 41～85％が分解されたが、5℃、14 日間の分解率は 21～52％であった。また、Ferguson ら[15] は南極の重機専用燃油（SAB）で汚染された土壌サンプル由来の液体集積物

を用いて、液体培地中の SAB 油の分解率が 4℃では 10℃とほぼ同程度であること、またその分解率は最大分解率（42℃）の約 15%であったと報告している。これらの実験結果は、分解速度は低下するものの、低温環境でも BR は有効であることを示している。南極の土壌を用いた Stallwood ら [16] の室内実験、Mohn ら [17]や Thomassin-Lacroix ら [18]が北極で行った石油分解の小規模なフィールド実験においても、低温下での BS の有効性が示されている。

サハリン産ヴィーチャーズ原油の性状　原油は黒褐色の粘性のある液体で、その中に非常に多くの化合物を含む。主要化合物は炭化水素であるが、硫黄、窒素、酸素を含む化合物も存在する。炭化水素は飽和分と芳香族分、レジン分、アスファルテン分と 4 つに分けられ、それぞれの成分含有比は、その原油が産出された地域によって大きく異なる。また、成分の違いが生分解性に大きな影響を与える [19]。

サハリン産ヴィーチャーズ原油の際立った特徴はその粘性の低さで、日本にも大量に輸入されている中東産アラビアンライト原油の約 3 分の 1 である。また、硫黄含有量もアラビアンライト原油の約 8 分の 1 と低く、工業利用の観点からは、ヴィーチャーズ原油は良質な原油である。また、ヴィーチャーズ原油はレジン分の含有量がアラビアンライト原油の半分程度で、アスファルテン分は検出されず、アラビアンライト原油に比べ、分枝状アルカン、多環芳香族炭化水素であるフェナンスレン類が多く含まれる。分枝状アルカンは直鎖状アルカンに比べて生分解されにくく、フェナンスレン類も難分解性の物質であることから、環境中への残留による被害が懸念される [20]。

サハリン油田開発に関わる石油流失事故の事例　サハリンでは油田の開発に伴って様々な石油流出事故が起きている。1999 年にサハリンⅡの掘削基地の貯蔵タンカーが流され約 480 L の重油が流出し、2004 年には座礁した浚渫船から 189 トンの重油が流出している。一方、2004 年にはパイプラインの油漏れによって 30,000 L の原油が流出している。さらに、2005 年にはサハリン I のチャイボ鉱区で作業船から約 5.5 トンのディーゼル油が流出している(FoE Japan)。ロシアの環境保護団体「サハリン環境ウオッチ」の 2009 年 4 月の報告によると、サハリン北部でパイプラインから流出した原油が川に流れ込み、同年 2 月上旬か

らの流出量が計 150 トン以上に上る事故が起きている（http://mediajam.info/topic/876531）。

サハリン油田及びサハリン近海での油流出事故は北海道沿岸地域にも影響を与えると考えられる。実際、2006 年早春知床半島を中心にした北海道オホーツク海沿岸に油に汚染された多数の海鳥が打上げられているのが発見された（北海道斜里町ＨＰ; http://www.town.shari.hokkaido.jp/he2005/umidori/umidori2.html）。この原因は特定されてはいないが、オホーツク海の海流と流氷の流れから、サハリン油田開発との関連性が指摘されている（FoE Japan ＨＰ; http://www.foejapan.org/aid/jbic02/sakhalin/okhotsk/20060406.html）。

北海道沿岸地域でのBSの取り組み　北海道はサハリン島の南に位置しており、東サハリン海流がサハリン島の東海岸を南下することは北海道がサハリン油田開発の影響を受けやすい主要因のひとつである（図4）。多数のタンカーの航行が見込まれる宗谷海峡（42 ｋｍ）の強風や、春から夏にかけて頻発する霧は、タンカーの事故の可能性を高め[6)]、冬期間の低温とともに流氷は汚染事故の処理をいっそう困難にすると思われる。一方で、オホーツク海は日本近海有数の漁場であり、2005年知床半島を中心とした地域、海域は世界遺産に登録されている（World Heritage HP ; http://whc.unesco.org/en/list/1193）。石油流出事故が何時起こるかは予測不能だが、事故が起きる場所と、被害が及ぶ場所・その程度は想定可能である。油汚染事故の被害を最小限に抑えるため、BR法を含む可能な限りの対応策を備えておくべきと考えられる[21)]。

牧ら[20, 22)]の国立環境研究所、北海道地質学研究などのグループはサハリン油田を原因とする石油汚染事故を想定して、北海道・オホーツク海沿岸のサロマ湖岸において、BSのフィールド試験を行なった。図1に示すように、この地域は特に脆弱な環境であるとされている。実験は、寒冷期である10月から翌年6月まで（平均気温5.4℃）と、温暖期である6月から11月まで（平均気温16.5℃）の２回に分け、ヴィーチャーズ原油を用いて行なわれた。農業用肥料を添加した実験区と、添加しないコントロール区を設定し、経時的にサンプルを採取し、原油総量の減少率と、代表的な炭化水素成分の分解率が調べられた。肥料添加区では、シクロヘキシルアルカン類などの炭化水素の分解が促進されることがわかった。し

かし、難分解性の高分子芳香族化合物であるフェナンスレン類や、ジベンゾチオフェン類については、肥料の添加による分解促進効果があまりみられず、土中に残留する傾向が見られた。この実験で得られた肥料添加による比較的易分解性の炭化水素の分解促進効果が、寒冷期の実験においてより顕著であったのは興味深い事実である。この実験によって、北海道の沿岸域で、しかも寒冷期でもBR（BS）が有効であることが示された。

原地性バイオオーグメンテーション法（ABA）とその可能性

ナホトカ号の事故後、アメリカのオッペンハイマー社の石油分解菌製剤「TerraZyme™」を用いたBA試験が兵庫県香住町において試みられ、その有効性が示されているが、この実験は微生物製剤を大規模に石油汚染現場に投入してBAを行ったわが国では貴重な事例である[23,24,25]。海岸線が、薄く、広範囲に漂着油によって汚染された場合は、人力による回収よりもBRがより有効と考えられる[21]。アメリカ合衆国においてはBAの実施例が多く、アメリカ環境保護庁（US Environmental Protection Agency）のHP（http://www.epa.gov/）には２０種類を超える微生物剤（bioremediation agents）が登録されている。しかし、BAがわが国において広く用いられることがなかったのは、外来性微生物を自然界に投与することが地域住民の同意を得にくいという問題があると思われる[21]。

Ueno ら[5]は人工的にディーゼル油で汚染させた水田土壌から単離した菌株、*Rhodococcus erythropolis* strain J、が同じ水田土壌中ではディーゼル油分解菌として取得されていた *Pseudomonas aeruginosa* WatG[26,27]よりも高いディーゼル油分解活性を示す（図 5）ことから、BA を実施する際に、土着の分解菌またはその混合物を利用することの有用性を指摘し、このような BA を Autochthonous bioaugmentation（原地性バイオオーグメンテーション、ABA）と名づけた（図 2, 3 参照）。

Hosokawa ら[28]及び永井[29]はサハリン油田を原因とする石油汚染事故が北海道沿岸に及んだ場合を想定し、オホーツク海に面した網走市の海岸から採取した砂を微生物源、原油（アラビアンライト）を炭素源として、同じ海砂を培養基質として集積培養を行い、原油分解微生物群（コンソーシアム２）を取得した。また、通常行われる無機塩を含む液体培地を用いて集積した原油分解微生物群（コ

ンソーシアム１）も取得し、網走市海岸の同じ場所で採取した海砂を原油で汚染させ、それにコンソーシアムを接種し、実験室レベルの ABA を行なった。その結果、コンソーシアム２がコンソーシアム１の２倍の原油分解率を示したが、コンソーシアム１を用いた BA と BS に差はなかった。BS 及び ABA の過程の海砂中の微生物群集構造を 16S rRNA 遺伝子の高度可変領域を対象とした PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（PCR-DGGE）で解析したところ、コンソーシアム２を接種した海砂には、原油分解菌に由来すると思われる多数の薄い DNA バンドがみられたのに対し、BS を行った海砂とコンソーシアム１を接種した海砂には、優占している数本の濃い DNA バンドがみられた。コンソーシアム１と２の原油分解率の差から、これらの濃い DNA バンドに由来する細菌の増殖が、コンソーシアム２でみられる原油分解菌の増殖を阻害していると考えられている。つまり、海砂中には多様な原油分解菌が存在するが、これらの菌の増殖は、特定の優占種によって妨げられ、それが原油の分解に影響を及ぼしている可能性が高いことが示唆されている。

また、コンソーシアム１由来の単離株は、無機塩液体培地中の原油を 2 週間で約 50%分解したが、海砂培地ではほとんど分解活性を示さなかった。一方で、コンソーシアム 2 からの単離株は、液体培地中では原油分解能を示さず、海砂培地では分解能を示した。この結果から、細菌を含む微生物の集積培養では、通常微生物がよく増殖する液体培地が用いられるが、そのようにして得られた菌群（または単離菌）は BA を液体培養条件で行なわない限り、その能力を示さないと考えられる。海岸の漂着油を BA により処理する場合には、その処理条件と類似した条件下で集積した微生物群、あるいはそれからの単離株を用いて行う BA, 即ち ABA がより有効であると考えられる。先に述べた Venosa ら[12)] の実験では現地の海水から取得した液体培養により集積した石油分解菌群を用いた BA（ABA とみなすことができる）も行なわれているが、その分解活性は BS と差がなかった。この事実も BA に用いる分解菌（群）の取得方法（集積方法）の重要性を示唆している。

結　　語

ITOPF (The international Tanker Owners Pollution Federation, UK) の統計によれ

ば過去30年間でタンカー事故の件数は約６分の１に減少している（http://www.itopf.com/）。タンカーの貯油槽を細分化して、仮に事故が起こっても漏洩を最小限にするなどの工夫も施されているという。しかし、2007年12月韓国西岸のTaean近海で起きたヘベイ・スプリット号の原油流出事故はエクソン・バルディス号の事故の3分の1の規模といわれ、韓国に大きな被害をもたらした（BBC HP；http://news.bbc.co.uk/2/hi/asia-pacific/7135896.stm）ように、タンカー事故を含む石油流出事故は石油を使う限り避けられないと見るべきである。特にわが国のように石油を産することがなく、かつ海に囲まれている国の場合はその対策を怠ってはならないと考えられる。

ABA の概念は新しいものではなく[30]、かつて“reinoculation （再接種）”と呼ばれ、実験室レベルで有効性が確認された事例も少なくない[21]。しかし、Thompson ら[31]の「汚染が起きてからの分解微生物を得るのは実用的でない」という指摘もあるように、従来はほとんど顧みられることはなかった。しかし、自然界の細菌類のほとんどが難培養性であるか、培養不可能である事実[32]がある一方で、それらの微生物は自然条件では連綿と種を維持していることを考えれば、自然により近い条件で、難培養性のものを含め、できるだけ多様な石油分解菌を培養（集積）して BA に利用しようとする技術（ABA）は理にかなっていると見ることもできるであろう。

サハリン油田を原因とする石油流出事故の影響を受ける海岸線は北海道に限定した場合でも総海岸距離3,062 ｋｍ（海上保安庁HP；http://www1.kaiho.mlit.go.jp/KAN1/soudan/kyori.html）の約半分の1,500 kmに及ぶ。その全ての区域でABAの実施を前提とした石油分解微生物の集積と蓄積は非現実的である。しかし、先に述べたESIマップを参考にした自然環境の脆弱性と、地域の経済的重要性なども考慮して、その沿岸域の微生物叢、石油分解菌の種類を調べ、ヴィーチャーズ原油分解菌群や単離株を取得し、その利用性についてのデータを蓄積して、万が一に備える必要があると考えられる。ABAをより実用的なものとするには、集積培養過程の迅速化など方法の改善と集積した菌群の有効な維持・管理方法の確立が必要である。また、微生物学、地質学、気象学、海洋学、石油工学の分野との連携により汚染が予想される地域、海域のデータ、予想

される汚染物質の種類や特性に関するデータを蓄積しておくことによって、一旦汚染事故が起きたときに、より短時間で効果的な汚染浄化が可能になると考えられる（図6参照）。

謝辞

本研究は北海道大学大学院学生として在籍していた上野晃生氏（現、帯広畜産大学）、永井基規氏（現、㈱メグミルク）、寺垣純氏（現、ホクレン農業共同組合連合会）、細川玲亜氏（現、東京大学大学院）の成果によるところが大きい。斜里町役場の増田泰氏には海砂サンプリングで協力を頂いた。本研究は科学研究費基盤（Ｃ；17510061)、ノーステック財団、ホクサイテック財団、住友財団、財団法人発酵研究所（ＩＦＯ）の支援により行なわれた。お礼を申し上げる。

文　　献

1) 戸田宏：スラブ研究センター研究報告シリーズ No.78. サハリン北東部大陸棚の石油・ガス開発と環境. 北海道大学スラブ研究センター, p.41–46（2001）.

2) 真柳直幸: スラブ研究センター研究報告シリーズ No.78 サハリン北東部大陸棚の石油・ガス開発と環境. 北海道大学スラブ研究センター, p. 47–66（2001）.

3) 濱田誠一：平成 21 年北海道立地質研究所調査研究報告会報告資料集, 北海道立地質研究所, p. 18–23 (2009).

4) 矢崎 真澄, 後藤 真太郎, 濱田 誠一, 沢野 伸浩, 佐尾 邦久, 佐尾 和子：地域安全学会梗概集, **17**, 11–14 (2005).

5) Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I. and Okuyama, H.: *World J. Microbiol. Biotechnol*., **23**, 1739–1745 (2007).

6) 佐伯 浩, 大塚 夏彦：サハリン大陸棚石油・ガス開発と環境保全 (村上 隆). 北海道大学図書刊行会, p.189– 204 (2003).

7) 増田 信彦： ナホトカ号沈没に伴う日本海沿岸地域への被害に関する社会経済的・生態的影響調査—1999 年日本海経済白書—, 富山大学環日本海地域研

究センター，p.93–105 (1999).

8) Lindstrom J. E., Prince R. C., Clark J. C., Grossman M. J., Yeager T R.., Braddock J. F., and Brown E. J.: *Appl. Environ. Microbiol*., **57**, 2514–2522 (1991).

9) Swannell, R. P. J., Lee, K., and Mcdonagh., M.: *Microbiol. Rev*., **60**, 342–365 (1996).

10) Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., and Ron, E. Z.: *Biodegradation*, **3**, 337–350 (1992).

11) Jiménez, N., Viñas, M., Bayona, J. M., Albaiges, J., and Solanas, A. M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **77**, 935–945 (2007).

12) Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Loyeeberhart, B., King, D., and Holder, E.: *Environ. Sci. Technol*., **30**, 1764–1775 (1996).

13) Venosa, A. D., and Zhu, X.: *Spill Science & Technology Bulletin.*, **8,** 163–178 (2003).

14) Mulkins–Phillips, G. J., and Stewart, J. E.: *Appl Microbiol.*, **28**, 915–922 (1974).

15) Ferguson, S. H., Franzmann, P. D., Snape, Ian., Revill, A. T., Trefry, M. G., and Zappia, L.R.: *Chemosphere*, **52**, 975–987 (2003).

16) Stallwood, B., Shears, J., Williams, P. A. and Hughes, K.A.: *Appl. Microbiol.*, **99**, 794–802 (2005).

17) Mohn, W. W., Radziminski, C. Z., Fortin, M. C., and Reimer, K. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 242–247 (2001).

18) Thomassin-Lacroix, E. J., Eriksson, M., Reimer, K. J., and Mohn, W. W.: *Appl.*

Microbiol. Biotechnol., **59**, 551–556 (2002).

19) Atlas, R. M.: *Appl. Microbiol.*, **30**, 396-403 (1975).

20） 牧　秀明、前川公彦、岡本 康男、濱田誠一： 用水と廃水, **50**, 1005–1011 (2008).

21) Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M. and Okuyama, H.: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 1519–1528 (2009).

22) 牧　秀明： 平成 21 年北海道立地質研究所調査研究報告会報告資料集, 北海道立地質研究所, p.15–17, (2009).

23) Hozumi, T., Tsutsumi, H. and Kono, M.: *Mar. Pollut. Bull.*, **40**, 308–314 (2000).

24) Tsutsumi, H., Hirota, Y. and Hirashima, A.: *Mar. Pollut. Bull.*, **40**, 315–319 (2000).

25) Tsutsumi, H., Kono, M., Takai, K., Manabe, T., Haraguchi, M., Yamamoto, I. and Oppenheimer, C.: *Mar. Pollut. Bull.*, **40**, 320–324 (2000).

26) Ueno, A., Hasanuzzaman M., Yumoto, I. and Okuyama, H.: *Curr. Microbiol.*, **52**, 182–185 (2006).

27）Wongsa, P., Tanaka, M. Ueno, A. Hasanuzzaman, M., Yumoto, I. and Okuyama, H.: *Curr. Microbiol.*, **49**, 415–422 (2004).

28) Hosokawa, R., Nagai, M., Kondo, H., Teragaki, J. and Okuyama, H.: *Contaminated Soils: Environmental Impact, Disposal and Treatment* (Steinberg, R.V.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, (2010). 印刷中.

29) 永井元規：北海道大学・大学院環境科学院　平成 20 年度修士論文, (2008).

30) Weber, W. J. Jr., and Corseuil, H. X.: *Water Res.*, **28**, 1407–1414 (1994).

31) Thompson, I. P., van der Gast, C. J., Ciric, L., and Singer, A. C.: *Environ. Microbiol.*, **7**, 909–915 (2005).

32） Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 782–787 (1990).

Table 1. Tanker oil spills and bioremediation (BR) treatment.

Year/ Month	Name of the tanker	Flag state	Oil spilt (tons)	Oil type	Country polluted	Type of BR implemented[a]	Ref.
1989/3	*Exxon Valdez*	USA	40,000	Crude oil	USA	BS	8,9, HP[b]
1991/8	–[c]	–	100	Crude oil	Israel	BS	10
1997/1	*Nakhodka*	Russia	6,200	Heavy oil	Japan	BA[d]	7, HP[b]
2002/11	*Prestige*	Bahamas	60,000	Heavy oil	Spain	BS	11
2007/12	*Hebei Spirit*	Hong Kong	10,800	Crude oil	Korea	–	HP[e]

[a] BS, biostimulation; BA, bioaugmentation.

[b] Home page, http://www.mlit.go.jp/kaiji/seasafe/safety11_.html

[c] No information is available.

[d] Experimental tests.

[e] Home page, http://news.bbc.co.uk/2/hi/asia-pacific/7135896.stm

Fig. 1.

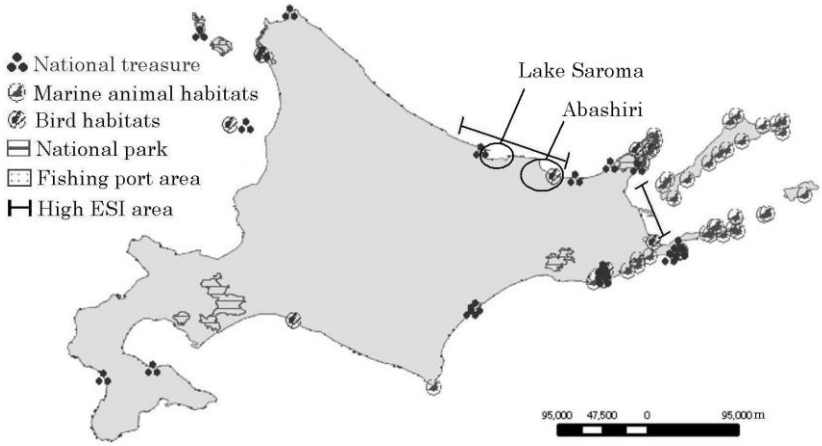

National treasure
Marine animal habitats
Bird habitats
National park
Fishing port area
High ESI area
Lake Saroma
Abashiri
95,000 47,500 0 95,000 m

Fig. 2

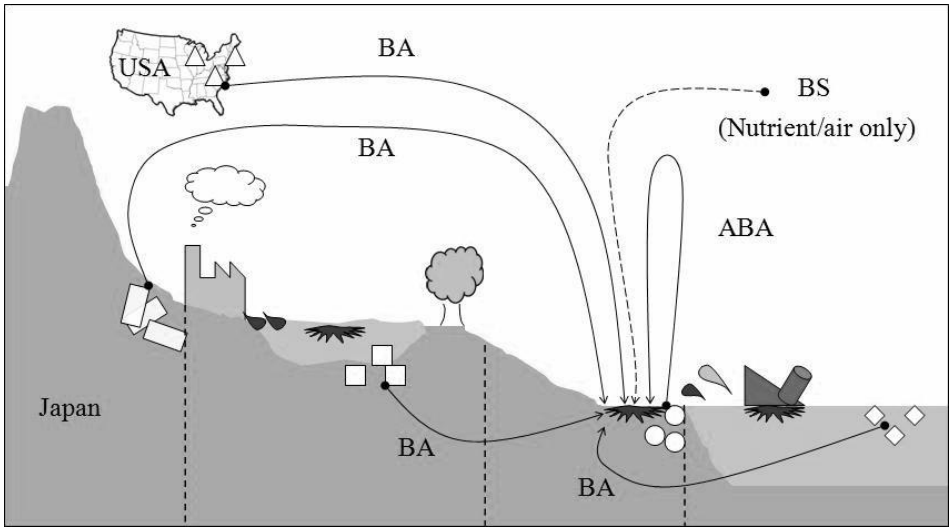


Fig. 3

Biostimulation (BS)
Enhances the activity of native microorganisms to degrade contaminants by adding nutrients or oxygen.

Advantages: Effective, because of the use of microorganisms best adapted to the environments of the site being treated.
Disadvantages: A longer process and ineffective with very high concentrations of pollutants.

Bioaugmentation (BA)
Enhances the biodegradation of contaminants using isolated contaminant-degrading microorganisms or their mixture, together with nutrients.

Advantages: Immediate effectiveness and use at sites where no biodegraders are available.
Disadvantages: Negative effects on native microorganisms, and difficulties in winning public acceptance

Autochthonous bioaugmentation (ABA)
Enhances the biodegradation of contaminants using microorganisms that are indigenous to the contaminated site or predicted contamination site. The process for enriching the microorganisms must be performed under conditions analogous to those where the ABA will be conducted.

Advantages: Immediate and stable effectiveness, low negative effect on the environment, and ease in winning public acceptance.
Disadvantages: High cost of preparations. No substantial data are available.

Fig. 4.

130°
140°
150°
East Sakhalin
current
Sakhalin
oil field
Russia
Pipeline
50°
Sakhalin
Sea of
Okhotsk
Soya Strait
Shipping route
of tankers
Shiretoko
Hokkaido
40°
Sea of Japan
Japan

Fig. 5.

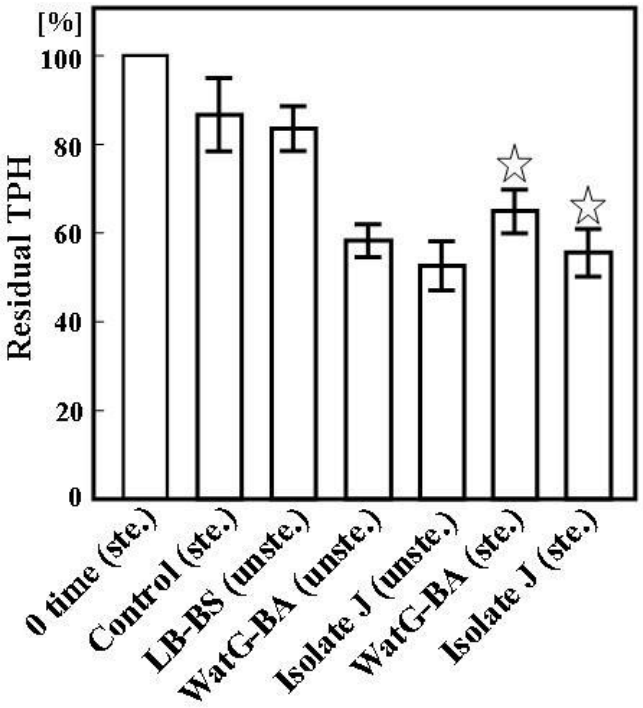
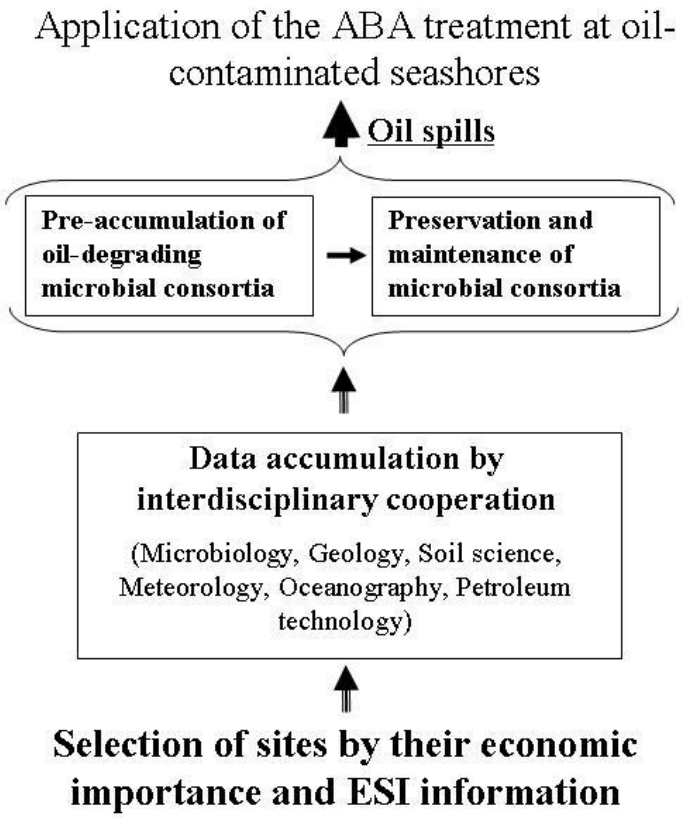

[%]
100
80
60
40
20
0
Residual TPH
0 time (ste.)
Control (ste.)
LB-BS (unste.)
WatG-BA (unste.)
Isolate J (unste.)
WatG-BA (ste.)
Isolate J (ste.)

Fig. 6.


Application of the ABA treatment at oil-contaminated seashores
Oil spills
Pre-accumulation of oil-degrading microbial consortia
Preservation and maintenance of microbial consortia
Data accumulation by interdisciplinary cooperation
(Microbiology, Geology, Soil science, Meteorology, Oceanography, Petroleum technology)
Selection of sites by their economic importance and ESI information

Feasibility of Bioremediation Technologies for Managing Oil Spills Caused by the Development of the Sakhalin Oil Fields

Naofumi Sakaguchi,[1,2] Ahmad Iskandar Bin Haji Mohd Taha,[3] Hideaki Maki,[4] Seiichi Hamada,[5] Masaaki Morikawa,[1,2,3] and Hidetoshi Okuyama[1,2,3,*]

(*Department of Biological Science, Faculty of Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0810*[1]; *Laboratory of Environmental Molecular Biology, Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0810*[2]; *Course in Environmental Molecular Biology and Microbial Ecology, Division of Biosphere Science, Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0810*[3]; *Marine Environment Research Team, Water and Soil Environment Division, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba 305-8506*[4]; *Geological Survey of Hokkaido, Otaru 047-0008*[5])

The oil fields at Sakhalin Island, Russia, reached a high level of operation in 2008. The Japanese island of Hokkaido is located to the south of Sakhalin, and is at risk of oil spills following explosions at the Sakhalin oil fields and from accidents involving pipelines and tankers at the fields and in the surrounding seas. Physical, chemical, and biological treatments are indispensable in cleaning up any contaminated regions, such

as seas and seashores. In this review, we describe various types of accidents, particularly those involving tanker oil spills around the world and the bioremediation (BR) treatment employed. We emphasize the usefulness of BR in colder regions, such as Hokkaido. Pioneering on-site biostimulation (BS) testing has been performed on the Hokkaido coast with the aim of dealing with oil contamination caused by oil spills at Sakhalin. In the BS process, appropriate nutrients other than carbon sources are supplied to contaminated soils or waters to activate native degraders of the contaminants. In another bioaugmentation (BA) process, isolated microorganisms and their mixtures can be used as degraders of xenobiotics. We proposed and tested a new bioremediation technology, autochthonous bioaugmentation (ABA), in which contaminant-degrading microorganisms indigenous to the contaminated site or predicted contamination site are isolated and used. The feasibility of applying ABA to oil spills caused by the development of the Sakhalin oil fields is discussed.

[**Key words:** autochthonous bioaugmentation, bioremediation, biostimulation, oil spill, Sakhalin oil field]

Figure legends

Fig. 1. The environmental sensitivity index (ESI) map of Hokkaido. This figure was cited from CeisNet (http://www2.kaiho.mlit.go.jp/index.html) and has been modified with permission.

Fig. 2. Illustrational presentation of biostimulation (BS), bioaugmentation (BA), autochthonous bioaugmentation (ABA) treatments. In BS (broken arrow), only nutrients and/or oxygen are introduced to soils to enhance the activity of native contaminants-degrading microorganisms. Foreign microorganisms derived from the various places are added to contaminated sites in BA. In ABA, native (autochthonous) microorganisms are used and these organisms should be enriched under the conditions mimicking the sites, where ABA will be implemented. Open symbols with different shape indicate individual site-specific oil-degrading microorganisms and/or their mixture, whose routes of transfer are shown by the solid arrow. Native microorganisms are shown by the open circle in this figure. See Figure 3 for details of BA, BA and ABA.

Fig. 3. Biostimulation (BS), bioaugmentation (BA), autochthonous bioaugmentation (ABA) and their characteristics.

Fig. 4. The locations of Hokkaido and Sakhalin Islands. The Hokkaido coastlines that are at risk of oil contamination from the Sakhalin oil fields are shown by the solid line. This figure is from reference 21 and has been modified with permission.

Fig. 5. Autochthonous bioaugmentation (ABA) using isolate J (*Rhodococcus erythropolis*) in paddy soil microcosms. Isolate J, an isolate from the paddy soil, was inoculated to sterilized (ste.) and unsterilized (unste.) soil microcosms consisting of paddy soil contaminated with diesel oil. *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG (WatG), which had been isolated as a diesel oil degrader from a water interceptor attached to the oil tank of a resident of Sapporo City, Hokkaido (ref. 27), was used as a control bacterium. All the soil microcosms were left at 20 °C for one week. Luria-Bertani medium (LB) was used to supply nutrients. The percentage of residual total petroleum hydrocarbon (TPH) was compared with the zero time samples. Each bar represents the mean value with the standard deviation (n=5). Stars indicate a significant difference at the $P < 0.05$ level of significance. This figure is from reference 5 with permission.

Fig. 6. Schematic presentation of the expected application process of autochthonous bioaugmentation (ABA) treatment. ESI is an abbreviation of environmental sensitivity index.